Einfluß von Endoxan (Cyclophosphamid) und 6-Mercaptopurin auf den Nucleinsäure-Stoffwechsel der Rattenmilz während der Synthese von Antikörpern gegen *Brucella abortus* *

H. KRÖGER und D. PAPANASTASIU

Biochemisches Institut der Universität Freiburg im Breisgau

J. POTEL

Asta-Werke, Chemische Fabrik, Brackwede/W.

(Z. Naturforsch. 23 b, 73—77 [1968] ; eingegangen am 30. Mai 1967)

1. Endoxan hemmt, insbesondere während der Erstimmunisierung, die Ausbildung von Antikörpern gegen *Brucella abortus*; 6-Mercaptopurin hat einen weitaus geringeren Effekt.
2. Beide Substanzen vermindern die DNS-Synthese in der Rattenmilz erheblich, die der RNS hingegen nur wenig.
3. Die Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase in der Rattenleber wird durch Endoxan nicht gestört.
4. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß bei der Erstimmunisierung zur Ausbildung der Antikörper eine DNS-Synthese unerlässlich ist.

In der vorangehenden Arbeit berichten wir über den Nucleinsäure-Stoffwechsel, der sich in der Rattenmilz vollzieht während der Erst- und Zweitimmunisierung mit *Brucella abortus*¹. In beiden Phasen der Antikörper-Bildung fanden wir die DNS-Synthese beträchtlich aktiviert, die RNS-Synthese hingegen nur wenig erhöht.

Bekanntlich wird die Antikörper-Synthese durch zahlreiche Substanzen beeinflusst². STENDER und Mitarb.^{3,4} sowie POTEL und BROCK⁵ stellten z. B. fest, daß Endoxan die Antikörper-Bildung gegen *Brucella abortus* stark hemmt, und zwar geschieht dies zu jedem Zeitpunkt der Synthese.

6-Mercaptopurin, ebenfalls ein Antimetabolit der Antikörper-Synthese², hemmt — im Gegensatz zu Endoxan — nur während der induktiven Phase⁶.

In dieser Arbeit beschäftigen wir uns mit der Wirkung von Endoxan und 6-MP auf den Nucleinsäure-Stoffwechsel der Rattenmilz während der Synthese von Antikörpern gegen *Brucella abortus*.

Methoden

1. Immunisierung

Die Immunisierung der Tiere wurde wie schon beschrieben durchgeführt¹. Der Antikörper-Titer wurde

* Über einen Teil dieser Untersuchungen wurde auf der Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Mainz 1966, berichtet.

** Abkürzungen: AMP = Adenosinmonophosphat; DNS = Desoxyribonucleinsäure; GMP = Guanosinmonophosphat; IMP = Inosinmonophosphat; 6-MP = 6-Mercaptopurin; RNS = Ribonucleinsäure.

¹ H. KRÖGER u. D. PAPANASTASIU, Z. Naturforsch., in Vorbereitung.

mittels Bakterien-Agglutinations-Reaktion und Wachstumsprobe bestimmt⁵.

2. Injektion von Endoxan und 6-Mercaptopurin

Endoxan wurde den Ratten intraperitoneal injiziert an drei aufeinander folgenden Tagen, jeweils 25 mg/kg Körpergewicht. Gleichzeitig mit der zweiten Endoxan-Injektion wurde auch das Antigen verabreicht.

6-MP wurde intravenös appliziert, ebenfalls an drei aufeinander folgenden Tagen, jeweils 20 mg/kg Körpergewicht. Das Antigen wurde wieder gleichzeitig mit der zweiten 6-MP-Injektion gegeben.

3. Isolierung der Nucleinsäuren

Bei der Erstimmunisierung erhielten die Tiere intravenös 36 Std. nach der Antigen-Gabe 10 μ C/100 g Körpergewicht ³H-Cytidin bzw. ³H-Thymidin. Bei der Zweitimmunisierung wurde das ³H-Cytidin 36 Std., das ³H-Thymidin 48 Std. nach der Antigen-Gabe verabreicht. Jeweils 20 Min. nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Milzen entnommen. Die Isolierung der Nucleinsäuren ist in der vorangehenden Arbeit besprochen worden¹.

Es ist jeweils die einfache Standardabweichung angegeben.

4. Enzym-Induktion

Diese wurde in der von KRÖGER und GREUER⁷ beschriebenen Weise durchgeführt.

² G. H. HITCHINGS and G. B. ELION, Pharmacol. Rev. 15, 365 [1963].

³ H. S. STENDER, D. STRAUCH u. H. WINTER, Strahlentherapie 115, 175 [1961].

⁴ H. S. STENDER, D. STRAUCH, H. WINTER u. W. TEXTOR, Arzneimittelforsch. 13, 1031 [1963].

⁵ J. POTEL u. N. BROCK, Arzneimittel-Forsch. 15, 659 [1965].

⁶ R. SCHWARTZ, J. STACK, and W. DAMESHEK, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 99, 164 [1958].

⁷ H. KRÖGER u. B. GREUER, Biochem. Z. 341, 190 [1965].

5. Präparate

^3H -Cytidin-(G) (spezifische Aktivität 1,9–4 C/mMol) und ^3H -Thymidin (6-T) (spezifische Aktivität 1,4–5 C/mMol) bezogen wir von The Radiochemical Centre, Amersham, England. 6-Mercaptopurin erhielten wir von Calbiochem, Luzern.

Ergebnisse

A. Erstimmunisierung

1. Einfluß von Endoxan

Die Ausbildung von Antikörpern gegen *Brucella abortus* wird durch Endoxan für annähernd 10 Tage vollständig verhindert (s. Abb. 1). Danach steigt der

Abb. 1. Einfluß von Endoxan auf die Synthese von Antikörpern gegen *Brucella abortus* während der Erstimmunisierung. ○—○ Bakterienagglutination, △—△ Wachstumsprobe, (a) *Brucella abortus*, (b) *Brucella abortus* + Endoxan. Angegeben sind Mittelwerte von 10 Tieren. Endoxan-Gabe: dreimal 25 mg/kg Körpergewicht i.p.

Titer im Serum allmählich an und erreicht etwa am 25. Tag die Kontrollwerte. Aus Tab. 1 ist zu ersehen, wie Endoxan auf den Nucleinsäure-Stoffwechsel der Rattenmilz wirkt. Es schränkt die DNS-Synthese erheblich ein, während die RNS-Synthese weitaus weniger gehemmt wird.

Da das Endoxan die Synthese der Antikörper gegen *Brucella abortus* verzögert, interessierte uns, ob auch die mit der Antikörper-Bildung verbundene Aktivierung der DNS-Synthese verspätet einsetzt. Wir untersuchten die DNS-Synthese zu verschiedenen Zeiten nach Endoxan- und Antigen-Gabe: etwa

	Einbau	
	^3H -Thymidin in DNS [IpM/mg DNS]	^3H -Cytidin in RNS [IpM/mg RNS]
Kontrolle	4168 ± 474	7176 ± 458
Kontrolle + Endoxan	1542 ± 217	3587 ± 1045
Bruc. abortus	12200 ± 2800	8471 ± 797
Bruc. abortus + Endoxan	1531 ± 423	4390 ± 1015

Tab. 1. Einfluß von Endoxan auf den Nucleinsäure-Stoffwechsel der Rattenmilz während der Erstimmunisierung. Angegeben sind Mittelwerte von 8–10 Tieren. Endoxan-Gabe: an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils 25 mg/kg Körpergewicht i.p.; Antigen-Gabe: zusammen mit der zweiten Endoxan-Injektion. 36 Std. nach dem Antigen erhielten die Tiere i.v. 10 μC ^3H -Thymidin bzw. ^3H -Cytidin/100 g Körpergewicht; 20 Min. danach wurden sie getötet.

48 Std. nach der Antigen-Injektion ist die DNS-Synthese nahezu ausgeschaltet (s. Abb. 2). Danach nimmt sie allmählich zu, und 6 Tage nach der Applikation des Antigens liegen Werte vor, die deutlich höher sind als die der Kontrollen.

Abb. 2. Einfluß von Endoxan auf die DNS-Synthese der Rattenmilz während der Erstimmunisierung. ●—● *Brucella abortus*, ○—○ *Brucella abortus* + Endoxan. Angegeben sind Mittelwerte von 6–8 Tieren. Endoxan-Gabe: dreimal 25 mg/kg Körpergewicht i.p. Zu den angegebenen Zeiten erhielten die Tiere i.v. 10 μC ^3H -Thymidin/100 g Körpergewicht; 20 Min. danach wurden sie getötet.

2. Einfluß von 6-Mercaptopurin

Abb. 3 läßt erkennen, daß 6-MP die Ausbildung von Antikörpern gegen *Brucella abortus* nur geringfügig hemmt. Der Nucleinsäure-Stoffwechsel in der Rattenmilz wird allerdings durch 6-MP ähnlich beeinflusst wie durch Endoxan: die DNS-Synthese wird beträchtlich, die RNS-Synthese aber kaum eingeschränkt (siehe Tab. 2).

Abb. 3. Einfluß von 6-Mercaptopurin auf die Synthese von Antikörpern gegen *Brucella abortus* während der Erstimmunisierung. O—O *Brucella abortus*, ▲—▲ *Brucella abortus* + 6-Mercaptopurin. Angegeben sind Mittelwerte von 8–10 Tieren. Der Antikörper-Gehalt wurde mittels Wachstumsprobe bestimmt. 6-Mercaptopurin-Gabe: dreimal 20 mg und zweimal 10 mg/kg Körpergewicht i.v.

	Einbau	
	³ H-Thymidin in DNS [IpM/mg DNS]	³ H-Cytidin in RNS [IpM/mg RNS]
Kontrolle	4168 ± 474	7176 ± 458
Kontrolle + 6-MP	3568 ± 1381	5723 ± 405
<i>Bruc. abortus</i>	12200 ± 2800	8471 ± 797
<i>Bruc. abortus</i> + 6-MP	5816 ± 1631	7144 ± 2202

Tab. 2. Einfluß von 6-Mercaptopurin auf den Nucleinsäure-Stoffwechsel der Rattenmilz während der Erstimmunisierung. Angegeben sind Mittelwerte von 8–10 Tieren. 6-MP-Gabe: an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils 20 mg/kg Körpergewicht i.v.; Antigen-Gabe: zusammen mit der zweiten 6-MP-Injektion. Weiteres s. Tab. 1.

B. Zweitimmunisierung

1. Einfluß von Endoxan

Aus Abb. 4 geht hervor, wie Endoxan bei einer Zweitimmunisierung mit *Brucella abortus* auf die Antikörper-Synthese einwirkt. Die Verhältnisse unterscheiden sich von denen bei der Erstimmunisierung. Schon direkt nach der Antigen-Gabe nehmen die Antikörper im Serum deutlich zu; allerdings werden die Kontrollwerte — auch in 21 Tagen — nicht erreicht. — Den Nucleinsäure-Stoffwechsel der Milz fanden wir bei der Erst- und Zweitimmunisie-

Abb. 4. Einfluß von Endoxan auf die Synthese von Antikörpern gegen *Brucella abortus* während der Zweitimmunisierung. O—O Bakterienagglutination, Δ—Δ Wachstumsprobe, (a) *Brucella abortus*, (b) *Brucella abortus* + Endoxan. Angegeben sind Mittelwerte von 8–10 Tieren. Endoxan-Gabe: dreimal 25 mg/kg Körpergewicht i.p.

rung durch Endoxan recht ähnlich beeinflusst. Tab. 3 zeigt, daß auch bei der Zweitimmunisierung die DNS-Synthese stark gesenkt, die RNS-Synthese hingegen weniger verändert wird.

	Einbau	
	³ H-Thymidin in DNS [IpM/mg DNS]	³ H-Cytidin in RNS [IpM/mg RNS]
Kontrolle	3170 ± 1071	6417 ± 836
<i>Bruc. abortus</i>	12166 ± 1938	8047 ± 943
<i>Bruc. abortus</i> + Endoxan	1780 ± 162	5784 ± 768

Tab. 3. Einfluß von Endoxan auf den Nucleinsäure-Stoffwechsel der Rattenmilz während der Zweitimmunisierung. Angegeben sind Mittelwerte von 8 Tieren. Endoxan- und Antigen-Gabe s. Tab. 1. 36 Std. bzw. 48 Std. nach dem Antigen erhielten die Tiere i.v. 10 μC ³H-Cytidin bzw. ³H-Thymidin/100 g Körpergewicht; jeweils 20 Min. danach wurden sie getötet.

2. Einfluß von 6-Mercaptopurin

Die Injektion von 6-MP bei der Zweitimmunisierung mit *Brucella abortus* bleibt wirkungslos auf die Ausbildung der Antikörper (s. Abb. 5). —

Die Untersuchung des Nucleinsäure-Stoffwechsels der Milz verlief wie erwartet: auch während der Zweitimmunisierung vermindert 6-MP die DNS-Synthese; wiederum wird der RNS-Stoffwechsel kaum berührt (s. Tab. 4).

Abb. 5. Einfluß von 6-Mercaptopurin auf die Synthese von Antikörpern gegen *Brucella abortus* während der Zweitimmunisierung. O—O *Brucella abortus*, ▲—▲ *Brucella abortus* + 6-Mercaptopurin. Angegeben sind Mittelwerte von 8 Tieren. Der Antikörper-Gehalt wurde mittels Wachstumsprobe bestimmt. 6-Mercaptopurin-Gabe: dreimal 20 mg und zweimal 10 mg/kg Körpergewicht i.v.

	Einbau	
	³ H-Thymidin in DNS [IpM/mg DNS]	³ H-Cytidin in RNS [IpM/mg RNS]
Kontrolle	3170 ± 1071	6417 ± 836
<i>Bruc. abortus</i>	12166 ± 1938	8047 ± 943
<i>Bruc. abortus</i> + 6-MP	6098 ± 1588	6385 ± 719

Tab. 4. Einfluß von 6-Mercaptopurin auf den Nucleinsäure-Stoffwechsel der Rattenmilz während der Zweitimmunisierung. Angegeben sind Mittelwerte von 8 Tieren. 6-MP- und Antigen-Gabe s. Tab. 2. Weiteres s. Tab. 3.

Diskussion

Unsere Untersuchungen zeigen, daß Endoxan bei Ratten während der Erstimmunisierung mit *Brucella abortus* die Ausbildung von Antikörpern erheblich einschränkt. Auch die DNS-Synthese in der Milz ist während dieser Periode stark gehemmt. Erst wenn die Wirkung des Endoxans auf die DNS-Synthese abklingt, lassen sich im Serum Antikörper nachweisen. Die Ursache der verminderten DNS-Synthese

ist noch unbekannt. Auch PALME et al.⁸ beobachteten, daß in proliferierenden Geweben die DNS-Synthese durch Endoxan gestört wird.

6-MP, das in der von uns verwandten Dosis die Ausbildung von Antikörpern gegen *Brucella abortus* während der Erstimmunisierung nur wenig herabsetzt, wirkt auf die DNS-Synthese in der Milz ähnlich wie Endoxan; der Effekt ist lediglich schwächer. Über den Mechanismus, der durch 6-MP ausgelöst wird, können wir noch nichts aussagen. In anderen Systemen hat man Beweise dafür, daß durch 6-MP die Überführung vom IMP zu AMP bzw. GMP verhindert wird⁹⁻¹¹. Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen darf geschlossen werden, daß die DNS-Synthese unerlässlich ist, damit Antikörper-bildende Zellen entstehen können. Es bleibt fraglich, ob die DNS-Synthese lediglich der Zellvermehrung dient, oder ob sie noch eine andere Funktion wahrnimmt.

Bei der Zweitimmunisierung wird die Antikörper-Synthese durch Anwesenheit von Endoxan nur wenig unterdrückt. Das deutet darauf hin, daß in diesem Zeitraum die DNS-Synthese bloß bedingt notwendig ist. Vermutlich sind kompetente Zellen vorhanden, die, angeregt durch das Antigen, direkt die spezifische Messenger-RNS bilden können.

Ein Befund sei hier noch angefügt. Es blieb zu klären, ob auch die Synthese der Messenger-RNS durch Endoxan und 6-MP veränderlich sei. Wir haben in früheren Untersuchungen schon festgestellt, daß 6-MP — auch in sehr hohen Dosen — die Induktion von Enzymen in der Rattenleber nicht beeinflusst⁷. In diesem Zusammenhang studierten wir

	Kontrolle	Induktion	Induktion unter Endoxan
L-Tyrosin	1,07 (2)	3,96 ± 0,76 (6)	4,08 ± 0,58 (8)
Cortison	1,26 (2)	6,65 ± 1,51 (4)	5,84 ± 1,37 (8)

Tab. 5. Einfluß von Endoxan auf die Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase in der Rattenleber. Anzahl der Tiere in Klammern. Endoxan-Gabe: an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils 25 mg/kg Körpergewicht i.p. Induktion: direkt nach der letzten Endoxan-Gabe. L-Tyrosin-Induktion: Die Tiere erhielten i.p. 600 mg L-Tyrosin/kg Körpergewicht; 4 Stdn. danach wurden sie getötet. Cortison-Induktion: Adrenaletomierte Tiere erhielten i.p. 40 mg Cortison/kg Körpergewicht; 4 Stdn. danach wurden sie getötet.

⁸ G. PALME, E. LISS, K. OEFF u. A. PLATIS, Arzneimittel-Forsch. **13**, 1034 [1963].

⁹ J. S. SALTER, D. J. HUTCHISON, and M. E. BALIS, J. biol. Chemistry **235**, 429 [1960].

¹⁰ A. HAMPTON, Federat. Proc. **19**, 310 [1960].

¹¹ J. D. DAVIDSON, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. **3**, 15 [1959].

nun noch die Wirkung von Endoxan auf die Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase. Wie Tab. 5 zeigt, bleibt die Induzierbarkeit des Enzyms trotz Endoxan erhalten. Die DNS-abhängige RNS-Synthese wird also durch die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen nicht gehemmt. Dieses Resultat kann als Bestätigung für unsere Schlußfolgerung

gewertet werden: Bei der Erstimmunisierung bedarf es unbedingt der DNS-Synthese, damit Antikörper gebildet werden.

Die Untersuchungen wurden unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, das Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung und die Stiftung Volkswagenwerk.

Über die Funktion der sauren Hefephosphatase

TH. GÜNTHER und W. KATTNER

Physiologisch-Chemisches Institut der Freien Universität Berlin

(Z. Naturforsch. **23 b**, 77—80 [1968]; eingegangen am 10. Juni 1967)

Die auf der Zelloberfläche lokalisierte, dereprimierbare saure Hefephosphatase hat keinen Einfluß auf anaerobe Glykolyse und Wachstumsgeschwindigkeit. Bei Phosphatmangel kann sie der Hefezelle im Medium vorhandene Phosphatester als Phosphatquelle erschließen. Die saure Hefephosphatase ist nicht identisch mit der intrazellulär wirksamen Phosphatase.

Die biologische Bedeutung der sauren Phosphatase ist unklar. Es wurde vermutet, daß die saure Hefephosphatase intrazelluläres Glucose-6-phosphat spalten und somit die maximale Glykolyserate begrenzen kann¹. Nach anderen Untersuchungen an *E. coli* ist die saure Phosphatase Bestandteil des Zuckertransportsystems². Eine Beteiligung am Phosphattransport der Hefezelle wurde nicht gefunden^{3, 4}. Da die saure Hefephosphatase ein dereprimierbares Enzym ist⁵⁻⁹, hat man die Möglichkeit, durch den Vergleich phosphatasearmer und phosphatasereicher Zellen desselben Hefestammes auf die Rolle der sauren Phosphatase im Stoffwechsel von Hefezellen zu schließen.

Methode

Züchtung der Zellen

Wir verwendeten Germaniahefe, Stamm A (Norddeutsche Hefeindustrie). Die Züchtung erfolgte in Erlenmeyer-Kolben im Brutschrank bei 30 °C unter Begasung mit Luft.

Das Kulturmedium enthielt im l 3,0 g (NH₄)₂SO₄, 0,25 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,25 g CaCl₂, 0,4 g KCl, 1 g Glycin, 1,5 g Hefeextrakt (Difco), 15 mg Penicillin G-Na, 25 mg Streptomycinsulfat und 5 mg Polymyxin B. Die jeweiligen PO₄-Konzentrationen sind in den Legenden enthalten.

Bei aerober Züchtung wurden 2%, bei anaerober 5% Glucose zugegeben. Anaerobe Bedingungen wurden durch Zugabe von 1 mMol KCN hergestellt. Hierbei wurde das Medium zusätzlich mit 0,05-m Succinat auf *p*_H 5,2 gepuffert.

Bestimmung der Zellmasse

Die Bestimmung der Zellmasse in den Kulturen erfolgte durch 20 min Zentrifugieren bei 1600 g in geeichten Hämatokritröhrchen oder durch Trübungsmessung bei 405 nm.

Proteinbestimmung

Die Zellen wurden durch 30 min Erhitzen bei 80 °C in 1-n. NaOH aufgeschlossen. Proteinbestimmung nach LOWRY et al.¹⁰.

¹ L. KIESOW u. S. DÜGE, Z. Naturforsch. **16 b**, 576 [1961].

² W. KUNDIG, F. D. KUNDIG, B. ANDERSON u. S. ROSEMAN, J. biol. Chemistry **241**, 3243 [1966].

³ A. ROTHSTEIN u. R. MEIER, J. cellular comparat. Physiol. **34**, 97 [1949].

⁴ G. W. F. H. BORST PAUWELS u. R. REIJNEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **93**, 659 [1964].

⁵ H. SUOMALAINEN, M. LINKO u. E. OURA, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **37**, 482 [1960].

⁶ C. F. HEREDIA, F. YEN u. A. SOLS, Biochem. biophysic. Res. Commun. **10**, 14 [1963].

⁷ G. SCHMIDT, G. BARTSCH, M. C. LAUMONT, T. HERMAN u. M. LISS, Biochem. J. **2**, 126 [1963].

⁸ W. L. McLELLAN u. J. O. LAMPEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **67**, 324 [1963].

⁹ R. WEIMBERG u. W. L. ORTON, J. Bacteriol. **89**, 740 [1965].

¹⁰ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].